

乳腺癌HER2免疫组化检测步骤

编者按：标准化操作是精准医疗的需要，也是病理科得以发展的必由之路，建立各种程序化 SOP 文件是其中的关键步骤。上海长征医院在这些方面成绩卓著，尤其是应用我公司的 HER2 (EP3) 兔单抗试剂，不仅顺利地通过了 PQCC 考核，而且在日常的工作中也取得了满意的结果。在此分享何金老师 SOP 文件中关于 HER2 染色的标准实验步骤，供大家参考。

1. 切片

将切片机的切片厚度调为 4 μ m，常规核对染色标签、免疫组化申请单及蜡块号，按要求捞贴组织切片，保证切片完整、平整、无气泡、无皱褶、无空洞。切片 55 $^{\circ}$ C 烤片过夜或 60 $^{\circ}$ C 烤片 2h。

2. 染色

2.1 将组织切片浸于二甲苯中室温脱蜡 2 次，每次 20min，随后浸入 100%乙醇中 3 次，每次 3min，将玻片依次室温置于 85%乙醇和 70%乙醇中各 2 分钟复水。

2.2 抗原修复 (pH9.0 EDTA)

取 20ml pH9.0 EDTA 抗原修复液放入量筒中，加蒸馏水至 1000ml 中，配制成 50 倍稀释的 pH9.0 的抗原修复工作液，然后倒入不锈钢锅中，把锅放置于电磁炉上，用大功率加热至沸腾。然后将功率调至中度，将切片置于耐高压塑料染色架上，放入沸腾的修复液中，继续加热 20 分钟。加热结束后迅速将锅移入水槽内冷却降温，冷却至室温后取出切片，流水冲洗干净。除去切片上的水分，在离组织 3mm 处用免疫组化油笔划线（注意不要太贴近组织），有利于集中试剂，防止干片提高染色效果。

2.3 PBS 冲洗 2 \times 3min，去除多余水分后滴加 3%过氧化氢 2 滴 (100ul)，室温孵育 10min，PBS 冲洗 2 \times 3min。

2.4 去除多余水分后滴加即用型兔抗人单克隆抗体 HER2 (EP3) 2 滴 (100ul)，室温孵育 60min，PBS 冲洗 2 \times 3min。



2.5 去除多余水分后滴加即用型 EnVision™ FLEX/HRP (SM802) 2 滴 (100ul) , 室温孵育 20min , PBS 冲洗 2×3min。

2.6 配制 DAB 显色液 , 取 EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER (SM803) 1ml , 加 EnVision™ FLEX DAB+ (DM827) 1 滴 , 混匀后滴加在切片上显色 8min。

2.7 蒸馏水洗终止显色 , 苏木素复染 1 分钟 , 流水冲洗 ; 1%盐酸酒精分化 2 秒钟 , 流水冲洗 , 温水返蓝。

2.8 梯度酒精脱水、二甲苯透明 , 中性树胶封片。

3. 质量控制

3.1 阳、阴性对照 :

用已知的乳腺癌 HER2 检测结果 1+、2+ 及 3+ 各一例 , 阴性对照为正常乳腺组织 , 用直径 3mm 组织芯片取样笔分别在 4 块组织上取样 , 然后制备成包含 4 个位点的组织芯片。每张切片必须同时捞贴 HER2 检测结果 0、1+、2+ 及 3+ 的组织芯片作为对照 ;

3.2 切片要求 :

切片厚 4μm , 55℃烤片过夜或 60℃烤 2h , 烤箱内同时放一支温度计监测温度 ;

3.3 检测过程严格时间控制 , 观察染色过程中有无出现异常情况 ;

3.4 经过测试的实验条件 , 未经科室许可 , 不得随便更改实验条件 ;

3.5 异常情况的处理 : 出现下列情况 , 必须重新检测 :

3.5.1 阳性对照组织脱片或无染色 ;

3.5.2 浸润癌的成份有皱褶或脱片 ;

3.5.3 阴性对照组织出现中等强度的染色 ;

3.6 定期 (每年 2-3 次) 参加室间质量评价活动。

